

На правах рукописи

Ибрагимова Ильсия Ильясовна

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ГЕНОВ-
СУПРЕССОРОВ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА,
МЕТИЛИРОВАННЫХ ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2008

Работа выполнена на кафедре биохимии ГОУВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина»

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Фаттахова Альфия Нурлимановна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
Лобкарев Олег Александрович
(доцент кафедры урологии и нефрологии
Казанской государственной медицинской
академии, г. Казань)

кандидат биологических наук
Саттарова Лилия Ирековна
(врач высшей категории межрегионального
клинико-диагностического центра, г. Казань)

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН

Защита состоится «30» октября 2008г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, ауд.209.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан «27» сентября 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Абрамова З.И.

*Посвящается памяти моего научного руководителя,
безвременно ушедшего из жизни, Аскаровой Альфии Наримановны,
а также памяти профессора Винтера Виктора Георгиевича*

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Рак предстательной железы является одной из главных причин смертности среди мужчин от злокачественных новообразований. В последние годы наблюдается значительный рост данного заболевания. В США рак предстательной железы занимает первое место в структуре онкологических заболеваний (более 186 тыс. новых случаев в 2008 г) и второе место по частоте летальных исходов среди мужчин (около 29 тыс. смертей в 2008 г) (Jemal et al., 2008). По величине прироста показателя заболеваемости в России РПЖ занимает 1-е место за период 1996-2006 гг. (величина прироста составила 128,26%) и во многом превосходит такие распространенные новообразования, как меланомы кожи и злокачественные заболевания легких и желудка (Чиссов, 2008).

Несмотря на успехи фармакологии в разработке противоопухолевых препаратов, до сих пор не было отмечено выраженного снижения смертности от рака простаты. Надежды сократить число смертей от данного заболевания основаны на раннем выявлении патологии, точности прогноза и эффективном лечении болезни в ее начальной стадии. Но ранняя диагностика крайне затруднена вследствие бессимптомного протекания болезни. В настоящее время для диагностики опухолей предстательной железы используются следующие методы: определение уровня простат-специфического антигена в плазме крови, пальцевое ректальное исследование, трансректальное ультразвуковое исследование и биопсия предстательной железы. Однако каждый из этих методов имеет ряд своих недостатков, что делает их использование не всегда эффективным (Lilja et al., 2008). Таким образом, очевидна необходимость поиска и внедрения в клиническую практику новых, более чувствительных и специфичных маркеров ранней диагностики рака предстательной железы.

Известно, что одной из важнейших причин перерождения нормальной клетки в неопластическую является нарушение функционирования генов-супрессоров опухолевого роста. Изменения в работе этих генов приводят к возникновению и прогрессии развития рака, а восстановление функции – к существенному замедлению пролиферации опухолевых клеток. Исследования последнего десятилетия показали, что наряду с генетическими событиями, обуславливающими инактивацию клеточных генов вследствие изменения последовательности ДНК, важную роль в процессе канцерогенеза играют также эпигенетические явления, не затрагивающие первичную структуру ДНК, но влияющие на экспрессию генов (Jones et al., 2002). Одним из таких

эпигенетических изменений является локальное гиперметилирование специфических последовательностей – CpG-островков, расположенных в 5'-регуляторных районах многих генов, которое влечет за собой подавление экспрессии гена либо в результате прямого ингибирования связывания транскрипционных факторов с ДНК, либо в результате привлечения корепрессоров транскрипции (Klose et al., 2006). До сих пор остается открытым вопрос о механизмах инициации гиперметилирования CpG-островков в процессе образования опухоли.

На данный момент известен ряд генов-супрессоров опухолевого роста, экспрессия которых нарушена вследствие гиперметилирования их CpG-островков и показана их ассоциация с различными видами опухолей (Esteller, 2002). Но в настоящее время все более актуальным становится поиск новых, ранее неизученных генов-супрессоров опухолевого роста, метилирование которых специфично для опухолей определенных видов, т.к. результаты подобных исследований открывают новые возможности, как для изучения механизмов канцерогенеза, так и для разработки методов диагностики, мониторинга, прогноза и терапии опухолей.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы состояла в идентификации потенциальных генов-супрессоров опухолевого роста, метилированных при раке предстательной железы.

Для ее достижения нами были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Провести ингибирование процесса метилирования ДНК в двух андроген – зависимых клеточных линиях рака предстательной железы LNCaP и MDA2b и в двух андроген – независимых клеточных линиях рака предстательной железы DU-145 и PC-3;
2. Идентифицировать гены, экспрессия которых увеличилась вследствие ингибирования процесса метилирования;
3. Провести скрининг идентифицированных генов на предмет их экспрессии в клетках морфологически нормальной предстательной железы и наличия CpG-островка в составе их промоторов;
4. Исследовать статус метилирования CpG-островков отобранных генов в клеточных линиях рака предстательной железы и морфологически нормальной ткани предстательной железы;
5. Провести анализ частоты метилирования в клинических образцах простатической интраэпителиальной неоплазии и рака предстательной железы различных стадий.

Научная новизна

В двух андроген – зависимых клеточных линиях рака предстательной железы LNCaP и MDA2b и в двух андроген – независимых клеточных линиях

рака предстательной железы DU-145 и PC-3 идентифицировано 170 генов, экспрессия которых увеличилась в результате ингибирования процесса метилирования ДНК. Из них промоторы двадцати пяти генов имели в своем составе CpG-островки, удовлетворяющие необходимым условиям, и их экспрессия в клетках нормальной предстательной железы была выше, чем при раковой патологии.

Впервые при анализе статуса метилирования CpG-островков двадцати пяти отобранных генов в клеточных линиях рака предстательной железы и морфологически нормальной ткани предстательной железы было показано, что гены TACSTD2, IFI30, KRT7, ANXA2, AQP3, PDLIM4, SLC15A3, GADD45b метилированы в клеточных линиях РПЖ, но не метилированы в норме.

Впервые проведен анализ частоты метилирования CpG-островков генов TACSTD2, IFI30, KRT7, ANXA2, AQP3, PDLIM4, SLC15A3, GADD45b в клинических образцах простатической интраэпителиальной неоплазии и рака предстательной железы различных стадий. Высокая частота метилирования генов PDLIM4, KRT7 и SLC15A3 при раке предстательной железы говорит о потенциальной возможности использования вышеперечисленных генов в качестве биологических маркеров ранней диагностики рака предстательной железы.

Практическая значимость

По результатам исследования получены данные, которые могут служить для разработки скрининговых тест-систем ранней диагностики рака простаты, использование которых может служить вспомогательным инструментом в выявлении раковых патологий на самых ранних стадиях, когда результаты патогистологических исследований не могут дать уверенного ответа о наличии или отсутствии новообразования.

Материалы исследования также представляют интерес в свете расширения понимания роли эпигенетических факторов в регуляции экспрессии ряда клеточных генов при злокачественной трансформации клетки, а также получения новых дополнительных знаний об участии некоторых клеточных генов в процессе канцерогенеза.

Положения, выносимые на защиту:

1. Из 170 генов, экспрессия которых увеличилась в результате эпигенетической реактивации генома клеточных линий рака предстательной железы, двадцать пять генов имеют в составе своих промоторов CpG-островки и транскрипционно активны в клетках морфологически нормальной предстательной железы. Гены TACSTD2, PDLIM4, ANXA2, IFI30, GADD45b, AQP3, KRT7, SLC15A3 метилированы в клеточных линиях рака предстательной железы,

2. Частота метилирования генов TACSTD2, GADD45b, KRT7, SLC15A3, PDLIM4 при простатической интраэпителиальной неоплазии

варьируется от 5% до 53%, при раке предстательной железы ранней стадии - от 10% до 70%; при раке предстательной железы поздней стадии - от 6% до 82%.

3. Гены ANXA2, IFI30, AQP3 метилированы в клеточных линиях рака предстательной железы, но не метилированы в клинических образцах простатической интраэпителиальной неоплазии и рака предстательной железы различных стадий.

Апробация работы

Основные результаты работы докладывались на международных конференциях: «Postdoctoral and Graduate Student Research Conference» (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA, 2007-2008); XLVI международная научная студенческая конференция "Студент и научно-технический прогресс" (Новосибирск, 2008); I Всероссийский конгресс студентов и аспирантов - биологов «Симбиоз-Россия-2008» (Казань, 2008); II международная конференция «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 1 статья в реферируемом журнале.

Структура работы. Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список литературы. Работа содержит 37 рисунков и 8 таблиц. Список литературы содержит 222 цитированных работ, из них 207 иностранных.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Клинические образцы рака предстательной железы (РПЖ), простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН) и морфологически нормальной предстательной железы были получены в госпитале ракового центра Фокс Чейз (Филадельфия, США) в результате оперативных вмешательств. Клинический диагноз был подтвержден патоморфологическим исследованием в отделении патоморфологии ракового центра Фокс Чейз. В общей сложности в работе было использовано 37 образцов ДНК, выделенной из опухолей пациентов с диагнозом РПЖ и 19 образцов – с диагнозом ПИН. В ходе исследования образцы РПЖ были разделены на две подгруппы. Первую подгруппу составляли образцы опухолей ранних стадий с суммой баллов по шкале Глисона не более 7; во вторую подгруппу были включены образцы опухолей с суммой баллов по шкале Глисона от 8 и выше. Средний возраст больных в первой подгруппе составил 55,9 лет (42-67 лет); во второй подгруппе – 64,1 года (54-82 года). Средний возраст больных ПИН на момент биопсии был 58,7 лет (50-74 лет). Также в работе были использованы три образца ДНК, выделенной из морфологически нормальной ткани

предстательной железы (ПЖ), полученной от пациентов с диагнозом рак мочевого пузыря в результате оперативного вмешательства. Средний возраст пациентов составил 70 лет (63-81 год). Отсутствие новообразований в ПЖ было подтверждено патоморфологическим исследованием. Также для исследования были отобраны андроген - зависимые LNCaP и MDA2b и андроген - независимые PC-3 и DU-145 клеточные линии РПЖ.

Методы исследования. В работе были использованы следующие методы исследования: microarray, реакция обратной транскрипции, выделение ДНК и РНК из клеточных культур, выделение ДНК из тканевых срезов, зафиксированных в парафине и из замороженных срезов тканей, бисульфитная модификация ДНК, гель-электрофорез нуклеиновых кислот, выделение продуктов ПЦР из агарозного геля, секвенирование, ПЦР, ПЦР в реальном времени. Оценку транскрипционной активности клеточных генов в клетках ПЖ и анализ их CpG-островка проводили с помощью он-лайн ресурсов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор клеточных линий и ингибиторов процесса метилирования.

В работе были использованы следующие клеточные линии РПЖ: андроген - зависимые клеточные линии LnCap и MDA2b, полученные из метастаз лимфатических узлов и костей; и андроген - независимые клеточные линии PC-3 и DU-145, полученные из костных метастаз и метастаз головного мозга соответственно. Наш выбор был обусловлен быстрой прогрессией опухолей предстательной железы от андроген - зависимого типа к андроген - независимому, что затрудняет их лечение вследствие потери чувствительности к гормональной терапии (Bokhoven et al., 2003).

В качестве ингибиторов процесса метилирования ДНК в работе были использованы 5-аза-2-деоксицитидин, представляющий собой химический аналог цитидина, обладающий способностью встраиваться в цепочку ДНК при репликации, вызывая ингибирование метилтрансферазной активности путем образования стабильного комплекса между 5-аза-2-диоксицитидиновым остатком в ДНК и активным центром фермента ДНК-метилтрансферазы (Mompalmer, 2005). Вторым ингибитором, также использованным в нашей работе, был трихостатин А - высокоспецифичный ингибитор гистондеацетилаз. Гистондеацетилазы синтезируются в большом количестве при различных видах опухолей. Эти ферменты катализируют процесс деацетилирования гистонов, в результате чего гистоны приобретают положительный заряд и прочно взаимодействуют с витками нуклеосомной ДНК. Таким образом, нуклеосомы приобретают компактное состояние и теряют способность взаимодействовать с факторами транскрипции (De Ruijter et al., 2003).

На предварительном этапе работы была определена оптимальная концентрация 5-аза-2-деоксицитидина, не вызывающая токсического эффекта. Было установлено, что концентрация 5 мкМ/л вызывает деметилирующий эффект с минимальным токсическим эффектом.

Microarray.

На первом этапе клетки клеточных линий РПЖ LNCaP, DU-145, PC-3 и MDA2b инкубировались в присутствии 5-аза-2-деоксицитидина (5 мкМ/л) и трихостатина А (500 нМ/л). Клетки контрольной группы инкубировались с эквивалентным количеством PBS и этанола. Из двух групп клеток, экспериментальной и контрольной, выделяли РНК, с последующим проведением реакции обратной транскрипции. Далее полученную кДНК метили с использованием флуоресцентных меток - производных индокарбоксицианина Cy3 и индодикарбоксицианина Cy5, и проводили реакцию гибридизации с ДНК чипом (MWG Biotech, Inc., High Point, USA), с иммобилизованными на нем 15 тыс. ДНК-зондами. Процесс гибридизации повторяли дважды с использованием метода flip-dye, при котором производилась взаимная замена использованных флуоресцентных меток. Одновременная детекция обоих сигналов в каждой из ячеек позволяет прямо сравнить их интенсивность и избежать ошибок, связанных с неполной воспроизводимостью результатов.

В ходе анализа результатов, полученных при двукратном повторении процесса гибридизации (рис. 1), были получены следующие данные. В клеточной линии РПЖ LNCaP двукратное увеличение экспрессии было зафиксировано в 663-х генах; в клеточной линии MDA2b – в 366 генах; в клеточной линии DU-145 – в 293-х генах; в клеточной линии PC-3 – в 641-м гене.

Рисунок 1. Результат сканирования слайда, полученного в результате гибридизации кДНК и ДНК чипа. Ячейки красного цвета соответствуют генам, экспрессия которых повысилась в результате ингибирования процесса метилирования ДНК. Ячейки зеленого цвета – генам с пониженной экспрессией. Ячейки желтого цвета – гены, экспрессия которых не изменилась.

Анализ экспрессии генов в клетках морфологически нормальной предстательной железы.

Для дальнейших исследований были отобраны 170 генов, экспрессия которых повысилась как минимум в три раза в трех из четырех клеточных линиях РПЖ. Далее был проведен сравнительный анализ уровня экспрессии идентифицированных генов в клетках морфологически нормальной ПЖ и ПЖ, пораженной раком. Используя базу данных Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), где представлены результаты исследований уровней экспрессии генов в различных органах, как в норме, так и при раковой патологии (<http://cgap.nci.nih.gov>), мы проанализировали экспрессию каждого гена в клетках нормальной ПЖ и ПЖ, пораженной раком. Отсутствие экспрессии в клетках морфологически нормальной ПЖ было показано для 103-х генов.

Анализ CpG-островков.

При анализе CpG-островков использовались три основных критерия: распределение CpG динуклеотидов по нуклеотидной последовательности, GC состав и длина последовательности.

Так, для оценки *распределения CpG динуклеотидов* вычисляется показатель Н/Т по следующей формуле:

$$\frac{H}{T} = \frac{n \times N}{N_C \times N_G}$$

где Н - наблюдаемое число CpG динуклеотидов; Т – теоретическое число CpG динуклеотидов; n – число CpG в последовательности; N – общее число нуклеотидов в последовательности; N_C – число остатков цитозинов; N_G - число остатков гуанина. Для CpG-островка этот показатель должен быть $\geq 0,6$. GC состав - доля цитозиновых и гуаниновых нуклеотидов в составе последовательности для CpG-островка должна быть не меньше 55%. Длина CpG-островка варьирует от 200 п.н. до несколько тысяч, составляя в среднем 1000 п.н. (Gardiner-Garden et al., 1987).

Данные условия отбора также способствуют исключению большинства Alu-повторяющихся элементов, которые могут входить в состав промоторов некоторых кодирующих белков генома человека и перекрываться с CpG-островками и цис-регуляторными модулями, представляющими собой кластеры сайтов связывания транскрипционных факторов, тем самым, влияя на экспрессию генов (Oei et al., 2004). Дополнительно с той же целью была использована компьютерная программа обнаружения повторов Repeat Masker (www.repeatmasker.org).

При анализе нуклеотидных последовательностей промоторов исследуемых генов на наличие CpG-островков в их составе использовалась компьютерная программа Webgene CpG island prediction (www.itb.cnr.it/sun/webgene/).

В результате анализа было установлено, что 16 генов не имеют в своем составе CpG островков; гены TLH29, APOD и CRYAB имеют в составе промоторов CpG-островки, не удовлетворяющие критериям отбора; ген TIMP1 располагается на X хромосоме; ген IGF2R является импринтированным, а ген JUNB - онкогеном. Анализ литературы показал, что 20 генов ранее были изучены и результаты исследований опубликованы.

Таким образом, для дальнейшей работы были отобраны 25 генов (табл. 1), большинство из которых представляют собой гены, кодирующие транскрипционные факторы, а также рецепторы, белки-переносчики, белки цитоскелета и иммунного ответа.

Таблица 1. Хромосомная локализация и краткая характеристика отобранных генов.

	<i>Ген</i>	<i>Хромосомная локализация</i>	<i>Функция гена</i>
1	H1F2	6p22.2	Конденсация нуклеосом
2	TBX1C	22q11.21	Транскрипционный фактор
3	ID1	20q11.21	Негативная регуляция транскрипции
4	GNAI3	17q24.1	Связывание нуклеотидов
5	RELB	19q13.32	Транскрипционный фактор
6	BASP1	5q15.1	Связывание ДНК в клетках НС
7	FOSL2	2p23.2	Транскрипционный фактор
8	IRF6	1q32.2	Транскрипционный фактор
9	GADD45b	9q22.2	Регуляция клеточных процессов
10	CTSD	11p15.5	Протеолиз
11	IFI30	19p13.11	Иммунный ответ
12	DAF	1q32.2	Активация комплиментов
13	FXRD5	19q13.12	Клеточная адгезия
14	KRT7	12q13.13	Организация цитоскелета и биогенез
15	PDLIM4	5q23.3	Организация цитоскелета
16	TACSTD2	1p32.1	Рецептор, регулятор уровня Ca^{2+}
17	ANXA2	15q22.2	Связывание иона кальция
18	ITGA3	17q21.33	Рецептор
19	ECGF1	22q13.33	Фактор роста
20	ARL6IP	16p12.3	Транспорт белков, клеточный сигналинг
21	AQP3	9p13.3	Транспорт белков, клеточный сигналинг
22	SLC15A3	11q12.2	Транспорт белков
23	ARL7	2q37.1	Связывание ГТФ и ГДФ
24	ACAA2	18q21.1	Ацетил-КоА-ацилтрансферазная активность
25	ASNS	7q21.3	Аспаратная и аспарагиновая активность

Определение статуса метилирования CpG-островков отобранных генов в клеточных линиях РПЖ и морфологически нормальной ткани ПЖ.

Для определения статуса метилирования CpG-островков отобранных генов в клеточных линиях РПЖ и морфологически нормальной ткани ПЖ были использованы методы бисульфитной модификации ДНК и секвенирования. При обработке ДНК бисульфитом натрия все неметилированные цитозины конвертируются в урацил, в то время как метилированные цитозины в составе CpG динуклеотидов остаются неизменными. В дальнейшем при амплификации исследуемого участка ДНК все остатки урацила и тимина амплифицируются как тимин и только 5-метилцитозин воспроизводится как цитозин.

В результате секвенирования промоторных участков двадцати пяти генов было установлено, что CpG-островки генов ANXA2, AQP3, IFI30, KRT7, PDLIM4, TACSTD2, SLC15A3, GADD45b метилированы в клеточных линиях РПЖ, но неметилированы в морфологически нормальной ткани ПЖ. Ген BASP1 метилирован и при патологии и в норме. Это связано, видимо, с тем, что продукт данного гена представляет собой белок аксонных окончаний нейронов и главным образом синтезируется в клетках нервной системы, т.е. ген BASP1 является тканеспецифическим геном, что и объясняет его метилированное состояние в морфологически нормальной ткани ПЖ. Результаты секвенирования остальных генов показали отсутствие метилирования и в клеточных линиях РПЖ и в морфологически нормальной ткани ПЖ (табл. 2).

Таблица 2. Статус метилирования CpG-островков в клеточных линиях РПЖ и морфологически нормальной ткани ПЖ.

	<i>Ген</i>	<i>LNCaP</i>	<i>DU-145</i>	<i>MDA2b</i>	<i>PC-3</i>	<i>НП1</i>	<i>НП2</i>	<i>НП3</i>
1	H1F2	-	-	-	-	-	-	-
2	TACSTD2	+	-	-	-	-	-	-
3	IFI30	+	-	-	+	-	-	-
4	DAF	-	-	-	-	-	-	-
5	ARL6IP	-	-	-	-	-	-	-
6	FXVD5	-	-	-	-	-	-	-
7	CTSD	-	-	-	-	-	-	-
8	KRT7	+	+	+	-	-	-	-
9	TBX1C	-	-	-	-	-	-	-
10	ANXA2	+	-	-	-	-	-	-
11	ID1	-	-	-	-	-	-	-
12	AQP3	+	+	+	-	-	-	-
13	PDLIM4	+	+	+	+	-	-	-
14	ECGF1	-	-	-	-	-	-	-
15	ACAA2	-	-	-	-	-	-	-

16	ITGA3	-	-	-	-	-	-	-
17	GNAI3	-	-	-	-	-	-	-
18	RELB	-	-	-	-	-	-	-
19	BASP1	+	+	+	+	+	+	+
20	ARL7	-	-	-	-	-	-	-
21	ASNS	-	-	-	-	-	-	-
22	FOSL2	-	-	-	-	-	-	-
23	SLC15A3	+	+	+	+	-	-	-
24	IRF6	-	-	-	-	-	-	-
25	GADD45g	+	+	+	-	-	-	-

(+) - образец метилирован; (-) – образец неметилирован; НП – образец нормальной ПЖ.

Анализ частоты метилирования генов PDLIM4, KRT7, SLC15A3, TACSTD2, AQP3, ANXA2, IFI30 в клинических образцах простатической интраэпителиальной неоплазии и рака предстательной железы ранней и поздней стадий.

Ген PDLIM4. Ген PDLIM4 локализован на 5 хромосоме в районе q23.3. Представляет собой двудоменный белок длиной 330 а.о. Ген PDLIM4 был идентифицирован как потенциальный ген-супрессор опухолевого роста, участвующий в поддержании нормального клеточного роста (Vallenius et al., 2004). Было установлено, что продукт данного гена модулирует работу нитей актина и ассоциирован с цитоскелетом клетки. Также PDLIM4 способен модулировать активность TRIP6 (транскрипционного коактиватора v-rel/ядерного фактора-кВ) (Cuppen et al., 2000; Zhao et al., 1999) и белка PTP-BL, участвующий в FAS-модулируемом апоптозе (Sato et al., 1995). Таким образом, PDLIM4 участвует в регуляции апоптоза по FAS/NF-кВ пути. Также было показано, что восстановление экспрессии изучаемого гена в опухолевых клетках кишечника приводит к уменьшению пролиферации и к снижению способности клонообразования, а также более чем двукратному увеличению частоты апоптоза, вызванного ультрафиолетовым облучением (Boumber et al., 2007). Учитывая, что PDLIM4 проявляет проапоптотические функции, подавление экспрессии данного гена может способствовать ускорению роста раковых клеток.

В результате эпигенетической реактивации было показано увеличение уровня экспрессии PDLIM4 в клеточных линиях рака предстательной железы в среднем в 3,5 раза. Характеристики CpG островка, входящего в состав промотора PDLIM4: Н/Т = 0,73, состав GC = 73%, длина 801 п.н. В ходе секвенирования промоторного участка метилирование было обнаружено во всех четырех клеточных линиях рака предстательной железы (рис. 2).

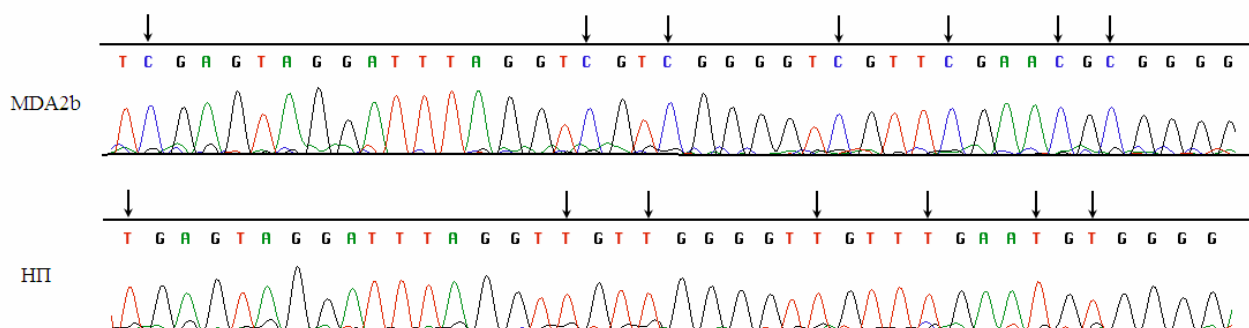


Рисунок 2. Хроматограммы сиквенсов продуктов ПЦР, полученных при амплификации бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена PDLIM4 в клеточной линии РПЖ MDA2b и в нормальной ткани предстательной железы (НП). Стрелками отмечено присутствие цитозина (С) в CpG-динуклеотидах в клеточной линии РПЖ и тимина (Т) – в нормальной ткани.

В ходе анализа частоты метилирования в клинических образцах было установлено, что в случае ранней стадии РПЖ метилированными были 65% образцов (13/20), на поздней стадии – 82% образцов (14/17). При ПИН метилирование было обнаружено только в 1 образце из 19 (5%). Такие результаты, по-видимому, связаны с тем, что ПИН, хотя и имеет большое количество общих иммунофенотипических и цитологических черт с карциномой, а также связана с ней территориально, все же не является предшественником развития рака. Высказывается мнение, что они обе вызываются одинаковыми этиологическими факторами, но наличие ПИН недостаточно и необязательно для возникновения карциномы простаты (Пожарисский и др., 2001). Обнаруженный нами факт сниженной частоты метилирования в образцах ПИН по сравнению с метилированием при РПЖ свидетельствует о том, что ген PDLIM4 специфично метилирован при РПЖ и о потенциальной возможности его использования в диагностике рака простаты.

Ген KRT7. Ген KRT7 принадлежит семейству кератинов, представляющих собой большое семейство 8-м промежуточных филаментов цитоскелета эпителиальных клеток. KRT7 представляет собой кератин II типа, состоящий из четырех α -спиральных сегментов с гептановыми повторностями гидрофобных остатков, характерных для биспирального участка. Цитокератины относятся к маркерам клеток эпителиальной природы. В процессе злокачественной трансформации клеток способность экспрессировать определенный спектр цитокератинов, характерных для данного типа тканей, сохраняется и в клетках опухоли, развившейся в этих тканях (Moll et al., 1982). Так, муцинозная аденокарцинома яичников экспрессирует цитокератины простого эпителия (в том числе цитокератин 7) (Vang et al., 2006). При раке толстого кишечника сохраняется специфический набор цитокератинов, характерный для кишечника (включая цитокератин 20, но не цитокератин 7) (Cerna et al., 2006). В настоящий момент данных о спектре кератинов, синтезирующихся при РПЖ, нет.

В ходе обработки клеточных линий РПЖ ингибиторами метилирования 5-аза-2-деоксицитидином и трихостатином А, уровень экспрессии гена KRT7 повысился приблизительно в семь раз в трех клеточных линиях (LNCaP – в 5 раз, MDA2b – в 12 раз, PC-3 – в 3 раза). Промоторная область данного гена содержит CpG островок длиной 952 п.н., GC состав = 68%, Н/Т = 0,76. Результаты секвенирования участка длиной 290 п.н., содержащего в своем составе 32 CpG динуклеотида, показали метилирование гена KRT7 в трех клеточных линиях LNCaP, DU-145, MDA2b, образцы нормальной ДНК и клеточной линии PC-3 были неметилированы (рис. 3).

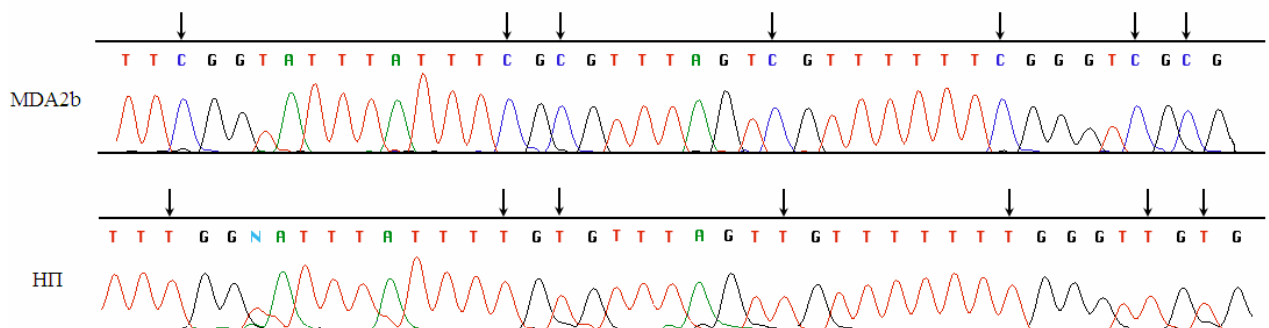


Рисунок 3. Хроматограммы секвенсов продуктов ПЦР, полученных при амплификации бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена KRT7 в клеточной линии РПЖ MDA2b и в нормальной ткани предстательной железы (НП). Стрелками отмечено присутствие цитозина (C) в CpG-динуклеотидах в клеточной линии РПЖ и тимина (T) – в нормальной ткани.

В ходе обработки клеточных линий РПЖ ингибиторами метилирования 5-аза-2-деоксицитидином и трихостатином А, уровень экспрессии гена KRT7 повысился приблизительно в семь раз в трех клеточных линиях (LNCaP – в 5 раз, MDA2b – в 12 раз, PC-3 – в 3 раза). Промоторная область данного гена содержит CpG островок длиной 952 п.н., GC состав = 68%, Н/Т = 0,76. Результаты секвенирования участка длиной 290 п.н., содержащего в своем составе 32 CpG динуклеотида, показали метилирование гена KRT7 в трех клеточных линиях LNCaP, DU-145, MDA2b, образцы нормальной ДНК и клеточной линии PC-3 были неметилированы (рис. 3).

Ген SLC15A3. Ген SLC15A3 является одним из четырех представителей SLC15 семейства, главной функцией которого является транспорт коротких пептидов в различные клетки. SLC15A1 преимущественно встречается в клетках эпителия кишечника и в протоках желчного пузыря, SLC15A2 – в эпителии почек, глии, легких, хороидного сплетения и молочной железы. SLC15A3 и SLC15A4 были открыты сравнительно недавно (Daniel et al., 2004). Их функция состоит в транспорте гистидина, но до сих пор остается не выясненным вопрос об их локализации. Предполагается, что они являются лизосомальными переносчиками гистидина из лизосом в цитоплазму, в качестве источника энергии использующие протонный потенциал. SLC15A3 преимущественно экспрессируется в эпителии легких, сердца, кишечника, предстательной железы и других органов. Изучение паттерна метилирования данного гена особенно интересно в свете последних данных, согласно которым

переносчики семейства SLC15 участвуют в транспорте лекарственных препаратов (Li et al., 2006)

Эпигенетическая реактивация генома клеточных линий РПЖ явилась причиной повышения уровня экспрессии данного гена в 2,8-3,2 раза по сравнению с контрольными клетками. В ходе анализа CpG-островка, входящего в состав промотора было установлено, что первый экзон содержит в себе два CpG-островка. Первый CpG-островок имел следующие характеристики: длина - 211 п.н., состав GC = 52%; Н/Т = 0,57. Длина второго CpG-островка составляла 651 п.н., состав GC был равен 69%; Н/Т = 0,73. Для дальнейшей работы был выбран второй CpG-островок, так как он имел лучшие показатели и располагался ближе к сайту старта транскрипции. Результаты секвенирования показали метилирование во всех четырех клеточных линиях рака предстательной железы. На рис. 4 приведены хроматограммы сиквенсов участка CpG-островка гена SLC15A3.

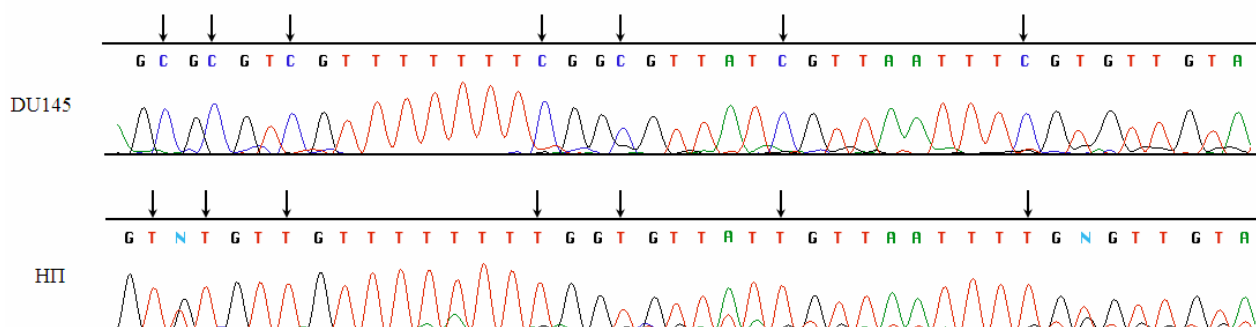


Рисунок 4. Хроматограммы сиквенсов продуктов ПЦР, полученных при амплификации бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена SLC15A3 в клеточной линии РПЖ DU-145 и в нормальной ткани предстательной железы (НП). Стрелками отмечено присутствие цитозина (C) в CpG-динуклеотидах в клеточной линии РПЖ и тимина (T) – в нормальной ткани.

В ходе анализа частоты метилирования гена SLC15A3 в клинических образцах было установлено, что в случае РПЖ ранней стадии частота метилирования составила 70% (14/20), РПЖ поздней стадии – 65% (11/17). В случае ПИН было метилировано 37% образцов (7/19). Такие высокие показатели метилирования в образцах рака предстательной железы различных стадий, как и в случае гена PDLIM4, свидетельствуют о возможности использования данного гена в качестве биологического маркера РПЖ в диагностике заболевания.

Ген TACSTD2. Ген TACSTD2 располагается на первой хромосоме в районе участка p32.1. TACSTD2 представляет собой трансмембранный гликопротеин клеточной поверхности. На данный момент о функциях этого гена известно немного. Предполагается, что он участвует в регуляции уровня кальция в клетке и выполняет функции рецептора (Ripani et al., 1998). Было обнаружено, что TACSTD2 экспрессируется в больших количествах в активно-

гиперметилирован в 68% случаях злокачественных глиом (Kim et al., 2006). До сих пор нет сведений об уровне экспрессии TACSTD2 при патологиях предстательной железы. Наши результаты демонстрируют отсутствие метилирования при ПИН, а небольшие показатели метилирования в образцах РПЖ возможно объяснить возрастными причинами: средний возраст пациентов, у которых было зафиксировано метилирование, составлял 60 лет в группе ранней стадии РПЖ и 72 года в группе поздней стадии РПЖ.

Ген GADD45b. Ген GADD45b располагается на участке 19p13.3 и кодирует белок весом 17,8 кДа и длиной 160 а.о. GADD45b принадлежит к группе генов, транскрипция которых повышается в ответ на стресс или воздействие ДНК-разрушающих веществ через активацию p38/JNK сигнального пути. Регуляция данного сигнального пути осуществляется путем связывания и индукции MTK1/MEKK4 киназ, которые, в свою очередь, являются активаторами p38 и JNK MAP-киназ. Таким образом, GADD45b участвует в регуляции процессов клеточного роста, репарации ДНК, клеточной выживаемости и апоптоза (Takekawa et al., 1998; Zhang et al., 1999). Было показано, что мутации в гене p53 могут вызывать снижение экспрессии гена GADD45b (Zhan Q. et al., 1994).

В результате обработки данных microarray анализа было установлено повышение экспрессии гена GADD45b в трех клеточных линиях в среднем в три раза. Анализ промоторного участка показал наличие CpG-островка длиной 1674 п.н., содержащего 145 CpG динуклеотидов. Результаты секвенирования продемонстрировали гиперметилирование в трех клеточных линиях РПЖ LNCaP, MDA 2b, DU-145 (рис. 6).

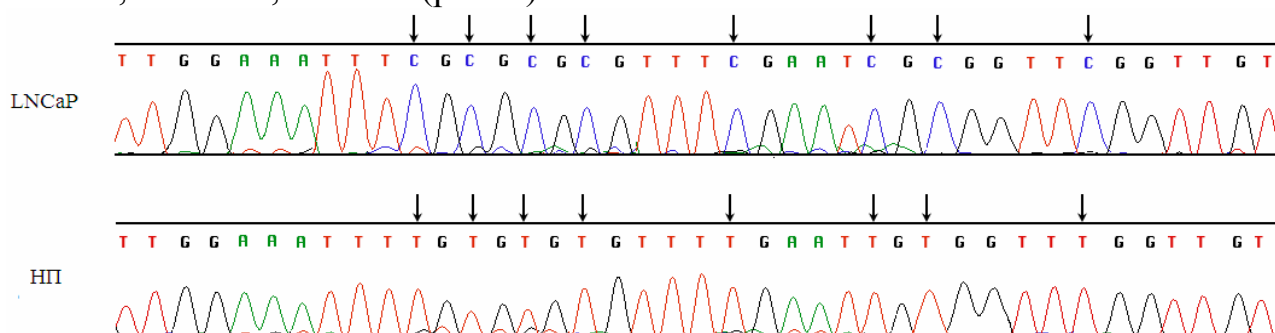


Рисунок 6. Хроматограммы секвенса продуктов ПЦР, полученных при амплификации бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена GADD45b в клеточной линии РПЖ LNCaP и в нормальной ткани предстательной железы (НП). Стрелками отмечено присутствие цитозина (C) в CpG динуклеотидах в клеточной линии РПЖ и тимина (T) – в нормальной ткани.

Дальнейшее исследование паттерна метилирования в клинических образцах методом ПЦР в реальном времени показало метилирование только одного образца опухоли простаты поздней стадии. Для подтверждения статуса метилирования, данный образец был просеквенирован (рис. 7).

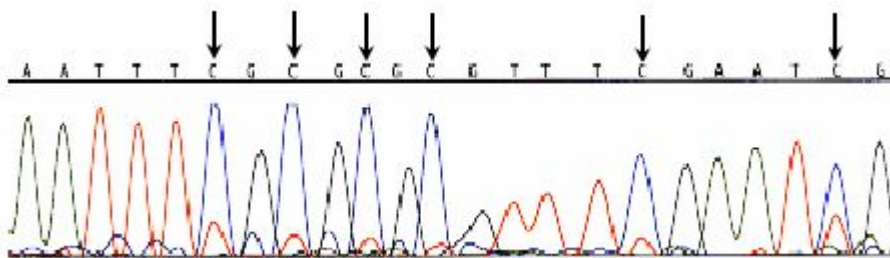


Рисунок 7. Хроматограмма сиквенса продукта ПЦР, полученного при амплификации образца №2545. Стрелками отмечено наличие цитозина в составе CpG-динуклеотида.

Таким образом, результаты нашего исследования продемонстрировали повышение экспрессии, последовавшее после эпигенетической реактивации генома клеточных линий РПЖ, но результаты анализа клинических образцов показал минимальное значение метилирования при различных патологиях ПЖ.

Ген AQP3. Ген AQP3 располагается на участке хромосомы 9p21.1. Аквапорин 3 (AQP3) представляет собой мембранный белок, принадлежащий семейству аквапоринов, белков водных каналов, благодаря которым осуществляется пассивное перемещение воды по осмотическому градиенту (Agre et al., 1993). К настоящему времени идентифицировано 11 членов данного семейства, которые можно разделить на 2 большие подгруппы. В целом, все аквапорины имеют схожую структуру и распределены между различными тканями организма. Белок аквапорин 3 чаще всего обнаруживается в базолатеральных плазматических мембранах клеток почек, эпидермиса, легких, кишечника и т.д. Хотя аквапорины не являются единственными молекулами, отвечающими за транспорт воды в клетку, предполагается, что они принимают участие в развитии ряда наследственных и приобретенных заболеваний, в том числе таких, как отек мозга, цирроз, сердечная недостаточность, глаукома, различные новообразования. Было показано отсутствие экспрессии гена AQP3 при мелкоклеточной карциноме легкого, плеоморфной карциноме и при метастазировании рака толстого кишечника (Liu et al., 2007).

В ходе нашего исследования в результате ингибирования процесса метилирования было установлено повышение уровня экспрессии гена AQP3 в 3,32-6,55 раз в трех клеточных линиях рака предстательной железы (LNCaP – в 3,32 раза, MDA2b – в 3,82 раза, PC-3 – в 6,55 раза). Исследуемый CpG-островок имел длину 544 п.н. и соответствовал всем критериям CpG-островка (состав GC = 70%, Н/Т = 0,65). Результаты секвенирования показали, что промоторная область гена AQP3 метилирована в клеточных линиях рака предстательной железы LNCaP и MDA2b, в то время как в двух других клеточных линиях и в нормальной ткани метилирование обнаружено не было (рис.8)

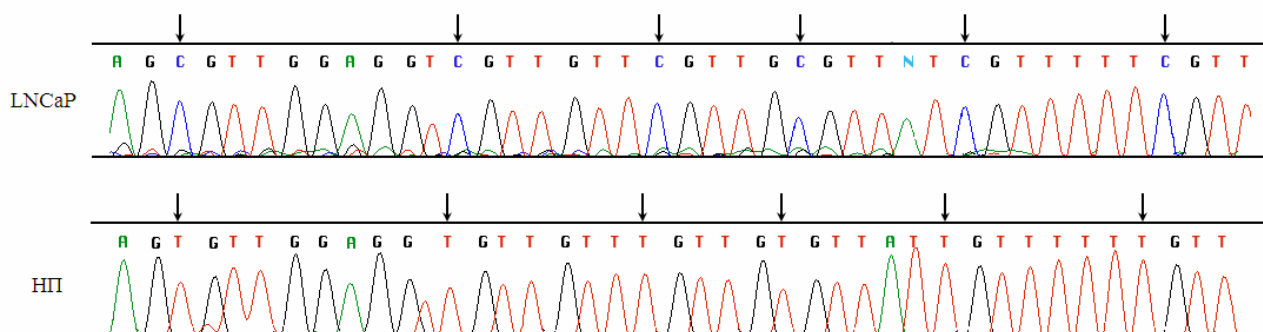


Рисунок 8. Рисунок 6. Хроматограммы сиквенса продуктов ПЦР, полученных при амплификации бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена AQP3 в клеточной линии РПЖ LNCaP и в нормальной ткани предстательной железы (НП). Стрелками отмечено присутствие цитозина (С) в CpG динуклеотидах в клеточной линии РПЖ и тимина (Т) – в нормальной ткани.

Далее в ходе анализа клинических образцов ПИН и РПЖ различных стадий с помощью методов количественной ПЦР в реальном времени и секвенирования было показано отсутствие локального гиперметилирования при различных патологиях ПЖ (рис. 9).

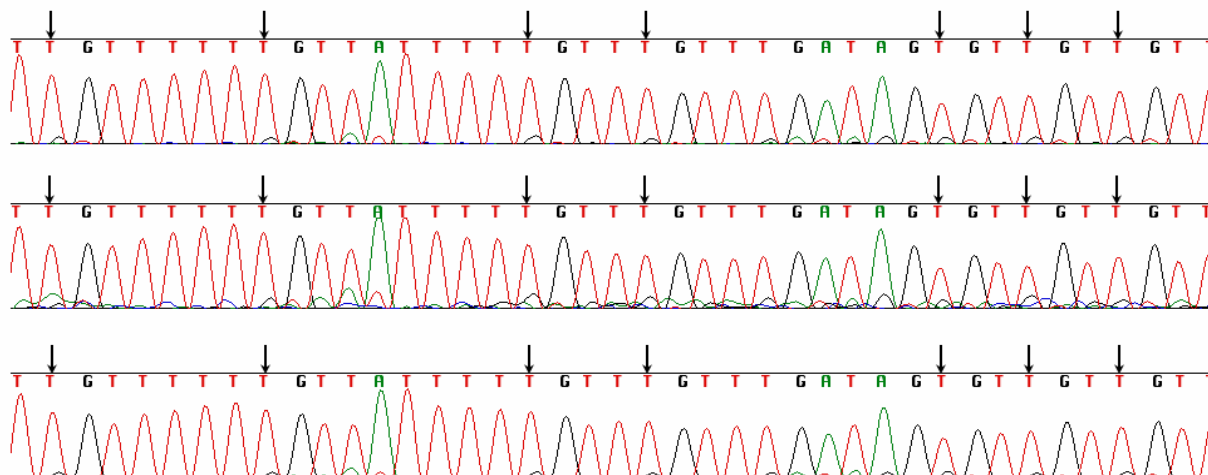


Рисунок 9. Хроматограммы сиквенса продуктов ПЦР, полученных при амплификации бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена AQP3 в клинических образцах РПЖ (а, б) и ПИН (в) Стрелками отмечены наличие тимина в составе CpG-динуклеотида, что означает отсутствие метилирования в образце.

Ген IFI30. IFI30 принадлежит семейству сульфогидрилредуктаз, способных катализировать процесс разрыва дисульфидных связей, преимущественно при нейтральных рН, однако IFI30 является уникальным ферментом, выполняющим свои функции при кислых значениях рН (4,5-5,5) (Arunachalam et al., 2000). Преимущественно данный белок синтезируется в антиген-представляющих клетках, но при этом обнаруживается во многих типах клеток. Его экспрессия индуцируется при действии таких цитокинов как интерферон- γ , интерлейкин 1 и др. IFI30 играет ключевую роль в денатурации

антигенов, предшествующей протеолизу и презентации фрагментов главным комплексом гистосовместимости II (Phan et al., 2000). Было продемонстрировано, что при различных меланомах уровень экспрессии гена IFI30 либо полностью прекращается, либо снижается до минимальных значений (Haque et al., 2002).

В результате microarray анализа было показано, что уровень экспрессии в клеточных линиях РПЖ LNCaP, PC-3, DU-145, MDA2b возрос в 5,2; 4; 2 и 3 раза соответственно. Исследованный CpG-островок находится в первом экзоне и имеет длину 353 п.н. GC состав = 67%, Н/Т = 0, 58. В результате секвенирования участка промотора длиной 279 п.н. было продемонстрировано метилирование в клеточных линиях LNCaP и PC-3 (рис. 10).

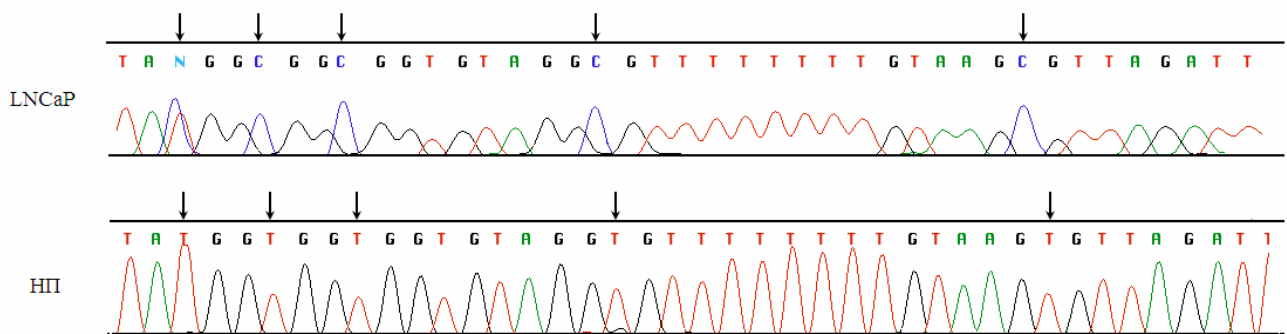


Рисунок 10. Рисунок 6. Хроматограммы сиквенса продуктов ПЦР, полученных при амплификации бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена IFI30 в клеточной линии РПЖ LNCaP и в нормальной ткани предстательной железы (НП). Стрелками отмечено присутствие цитозина (C) в CpG динуклеотидах в клеточной линии РПЖ и тимина (T) – в нормальной ткани.

Результаты анализа частоты метилирования показали отсутствие метилирования в клинических образцах ПИН и РПЖ различных стадий. На рис. 11 представлены хроматограммы сиквенсов трех клинических образцов.

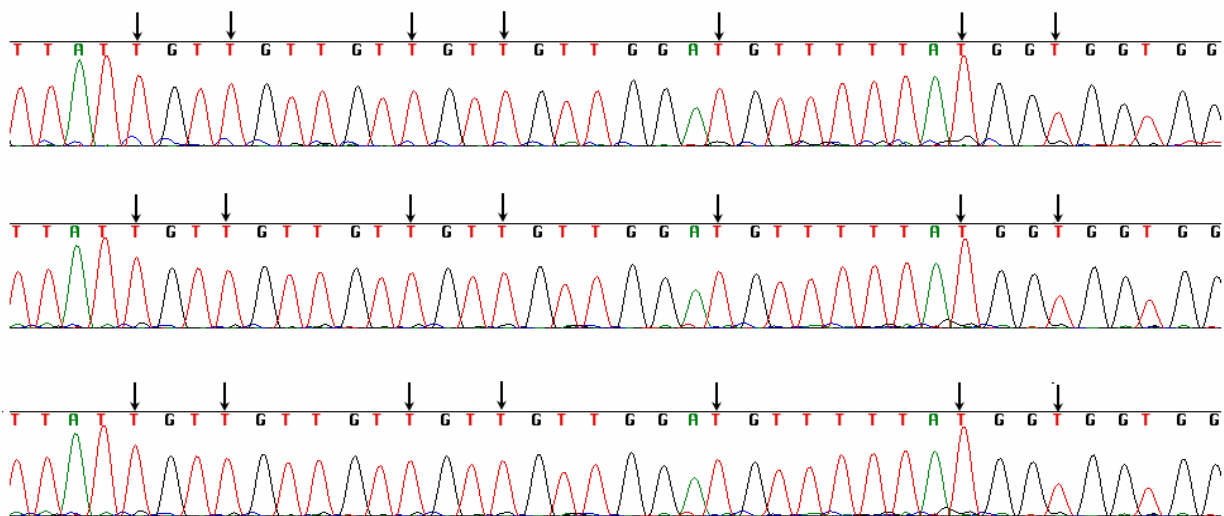


Рисунок 11. Хроматограммы сиквенса продуктов ПЦР, полученных при амплификации

бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена IFI30 в клинических образцах РПЖ (а, б) и ПИН (в) Стрелками отмечены наличие тимина в составе CpG-динуклеотида, что означает отсутствие метилирования в образце.

Ген ANXA2. Ген ANXA2 располагается на пятнадцатой хромосоме, на участке q22.2. Аннексины – семейство Ca^{2+} -зависимых белков с фосфолипидо-связывающей активностью. На данный момент открыто более 20 различных аннексинов (Morgan et al., 1997). ANXA2, известный также как р36, липокортин II и калпактин I, изначально был идентифицирован как одна из главных мишеней для фосфорилирования белком pp60 (Erikson et al., 1980). ANXA2 существует в формах мономера, гетеродимера и гетеротетрамера (совместно с белком p11). До сих пор функция ANXA2 до конца не выяснена. Предполагается, что он принимает участие в Ca^{2+} -зависимом экзо-, эндоцитозах, в клеточной адгезии (Mai J. et al., 2000), пролиферации (Chiang Y. et al., 1999), фибринолизе клеточной поверхности (Hajjar K.A. et al., 2000), а также в формировании остеокластов и костной резорбции (Takahashi S. et al., 1994). Было показано, что в опухолевых клетках предстательной железы снижена или полностью отсутствует экспрессия ANXA2, и что реэкспрессия данного гена приводит к замедлению метастазирования опухоли, но не влияет на пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток (Liu et al., 2003). Обработка клеток клеточных линий РПЖ ингибиторами процесса метилирования вызвала повышение экспрессии гена ANXA2 в 3,1-3,6 раз. Анализ промоторного участка показал наличие CpG-островка длиной 912 п.н. Состав GC = 65,9%, Н/Т = 0,68. Для анализа статуса метилирования гена ANXA2 были сконструированы праймеры для участка длиной 391 п.н., содержащего 41 CpG динуклеотидов. Результаты секвенирования представлены ниже на рис.12.

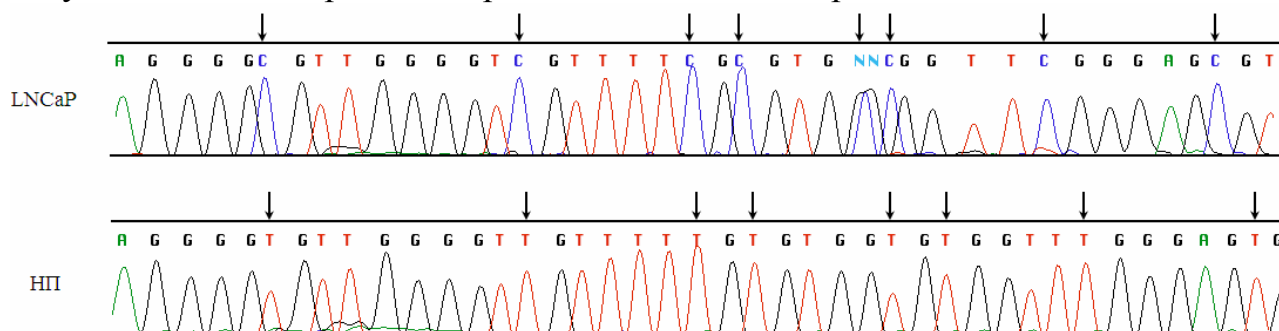


Рисунок 12. Рисунок 6. Хроматограммы сиквенса продуктов ПЦР, полученных при амплификации бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена ANXA2 в клеточной линии РПЖ LNCaP и в нормальной ткани предстательной железы (НП). Стрелками отмечено присутствие цитозина (C) в CpG динуклеотидах в клеточной линии РПЖ и тимина (T) – в нормальной ткани.

Метилирование CpG-островка гена ANXA2 было показано только для клеточной линии РПЖ LNCaP. Анализ клинических образцов РПЖ и ПИН с использованием методов секвенирования и ПЦР в реальном времени продемонстрировал отсутствие метилирования (рис.13).

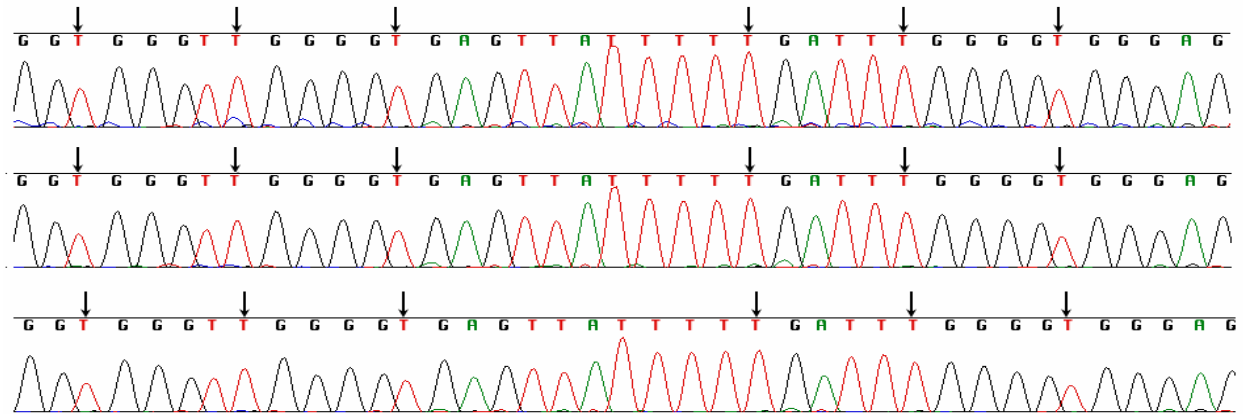


Рисунок 13. Хроматограммы сиквенса продуктов ПЦР, полученных при амплификации бисульфит-модифицированной ДНК промоторного участка гена ANXA2 в клинических образцах РПЖ (а, б) и ПИН (в) Стрелками отмечены наличие тимина в составе CpG-динуклеотида, что означает отсутствие метилирования в образце.

Таким образом, отсутствие метилирования в генах AQP3, IFI30, ANXA2 в клинических образцах ПИН и РПЖ различных стадий свидетельствуют о минимальном влиянии эпигенетических механизмов на регуляцию экспрессии вышеперечисленных генов.

ВЫВОДЫ

1. В двух андроген – зависимых клеточных линиях рака предстательной железы LNCaP и MDA2b и в двух андроген – независимых клеточных линиях рака предстательной железы DU-145 и PC-3 идентифицировано 170 генов, экспрессия которых увеличилась в результате ингибирования процесса метилирования ДНК.

2. Из 170 генов, экспрессия которых увеличилась в результате ингибирования процесса метилирования ДНК, 25 имеют в составе своих промоторов CpG-островки и транскрипционно активны в клетках морфологически нормальной предстательной железы;

3. Гены TACSTD2, PDLIM4, ANXA2, IFI30, GADD45b, AQP3, KRT7, SLC15A3 метилированы в клеточных линиях рака предстательной железы, в отличие от морфологически нормальной ткани простаты, где метилирование данных генов обнаружено не было;

4. CpG-островок промотора гена PDLIM4 гиперметилован в образцах рака предстательной железы. Частота метилирования гена PDLIM4 составила 65% при раке предстательной железы ранней стадии и 82% при раке предстательной железы поздней стадии. Такие высокие показатели частоты метилирования свидетельствует о потенциальной возможности использования гена PDLIM4 в ранней диагностике рака предстательной железы.

5. Частота метилирования гена KRT7 в образцах рака предстательной железы ранней стадии составила 70%, в образцах рака предстательной железы поздней стадии – 35%, при простатической интраэпителиальной неоплазии – 53%.

6. Частота метилирования гена SLC15A3 составила 70% при раке предстательной железы ранней стадии, 65% при раке предстательной железы поздней стадии, 37% при простатической интраэпителиальной неоплазии.

7. Анализ частоты метилирования генов TACSTD2 и GADD45b в клинических образцах простатической интраэпителиальной неоплазии и рака предстательной железы продемонстрировал невысокий показатель метилирования, что говорит о небольшом вкладе эпигенетических механизмов в регуляцию экспрессии данных генов.

8. Анализ частоты метилирования в клинических образцах простатической интраэпителиальной неоплазии и рака предстательной железы различных стадий показал отсутствие метилирования генов ANXA2, AQP3, IFI30.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Ibragimova I.I.** Methylation of tumor-suppressor genes in prostate cancer / **I.I. Ibragimova**, P.J. Cairns // abstracts / Postdoctoral and Graduate Student Research Conference. - Philadelphia (USA), 2007.
2. **Ibragimova I.I.** Methylation of PDLIM4 gene in prostate cancer / **I.I. Ibragimova**, P.J. Cairns // abstracts / Postdoctoral and Graduate Student Research Conference. - Philadelphia (USA), 2008.
3. **Ибрагимова И.И.** Метилирование промоторного участка гена PDLIM4 при раке предстательной железы / **И.И. Ибрагимова**, А.Н. Фаттахова // Материалы XLVI международной научной студенческой конференций "Студент и научно-технический прогресс". - Новосибирск, 2008. – С.37-38.
4. **Ибрагимова И.И.** Изучения статуса метилирования генов BASP1, PDLIM4, IFI30, ARL6IP при раке предстательной железа / **И.И. Ибрагимова**, А.Н. Фаттахова // Сборник материалов I Всероссийского конгресса студентов и

аспирантов - биологов «Симбиоз-Россия-2008». - Казань, 2008. – С. 14-15.

5. **Ибрагимова И.И.** Анализ метилирования генов-супрессоров опухолевого развития при раке предстательной железы / **И.И. Ибрагимова**, А.Н. Фаттахова // Материалы научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». - Казань, 2008. – С.34

6. Ibanez de Caseres I. Identification of novel tumor suppressor genes by epigenetic reactivation in prostate cancer / I. Ibanez de Caseres, **I. Ibragimova**, A. Hoffman, P. Cairns, A.N. Fattahova // Материалы научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». - Казань, 2008. – С.159-160.

7. **Ибрагимова И.И.** Анализ метилирования промоторного участка гена PDLIM4 при раке предстательной железы / **И.И. Ибрагимова**, А.Н. Фаттахова // Ученые записки Казанского Государственного Университета. – 2008. – Т.150. - №2. – С.136-143.

8. Акберова Н.И. Метилирование генов-супрессоров при раке простаты / Н.И. Акберова, **И.И. Ибрагимова** // Учебное пособие по курсу «Биоинформатика». – Казань, 2008.

Отзывы на автореферат просьба отправлять по:

e-mail: ilsiya20@rambler.ru

факсу: (843) 238-71-21